文章编号：0454-6296（2000）增刊-0201-03

粘虫蛹脑促前胸腺激素样活性物质对前胸腺合成和分泌的影响

欧阳迎春，唐 爽，关雪辰
（中国科学院动物研究所，北京 100080）

中图分类号：Q 965　　文献标识码：A

促前胸腺激素（Prothoracicotropic hormone，PTTH）是由脑神经内分泌细胞产生的，调节前胸腺合成和分泌蜕皮甾类激素。PTTH 是在昆虫中发现的第一个激素，也是在动物中发现的第一个神经激素[1]。到目前为止，研究人员已分离纯化了烟草角蛾 *Manduca sexta* 和家蚕 *Bombyx mori* 的 PTTH[2]，并弄清了家蚕 PTTH 的基因和氨基酸序列[3]。我国关于 PTTH 的研究主要集中在少数几种昆虫上[4,5]。本文应用蜕皮甾类激素放射免疫测定方法和前胸腺离体培养技术，以我国重要的农业害虫粘虫 *Mythimna separata* 为研究对象，研究 PTTH 作用和前胸腺分泌活动的特点，为 PTTH 的研究积累更多的数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

粘虫幼虫以人工饲料[6]饲养，温度为（25±1)℃，光周期为 16 h 光照，8 h 黑暗。

1.2 PTTH 样活性物质的提取

定量摘取化蛹后 0～3 h 的蛹脑，立即放入盛有冰重蒸水的微量匀浆器中，冰水浴匀浆 10 min，匀浆物沸水浴加热 2 min，立即冷却，以 10 000 r/min 的转速，离心 5 min，取上清液，沉淀重复抽提一次，合并两次上清液，冷冻干燥后，－20℃保存，使用时用 Grace 液（Gibco 公司生产）稀释。

1.3 前胸腺的体外培养

前胸腺在解剖镜下，成对摘取自末龄幼虫。将一侧前胸腺放入 50 μL 含蛹脑提取物的 Grace 液（pH 为 6.6）中，另一侧放入等体积的不含蛹脑提取物的 Grace 液中作为对照，25℃，黑暗，高湿，悬浮培养。培养一定时间后吸取部分培养液，进行蜕皮甾类激素的放射免疫测定。

1.4 蜕皮甾类激素的放射免疫测定

蜕皮甾类激素的放射免疫测定参考曹梅讯等[7]建立的方法。蜕皮激素放射免疫测定药盒由中国科学院上海昆虫所曹梅讯提供。由于标准品为 20-羟基蜕皮酮，所以蜕皮激素含量以 20-羟基蜕皮酮当量折算。

2 结果

2.1 前胸腺合成分泌蜕皮甾类激素的时相进程

一组末龄 4 天幼虫的前胸腺，一侧在含有 1 个蛹脑当量蛹脑提取物的培养液中，另一侧培养液中不含蛹

基金项目：国家自然科学基金重点项目（39630050）
收稿日期：1999-07-19，修订日期：2000-01-26

脑提取物，分别培养2，4，6，8 h后收集培养液，进行蜕皮甾类激素的放射免疫测定。从图1可以看出，前胸腺在不加蛹脑提取物的培养液中，蜕皮甾类激素的合成和分泌在8 h的培养中保持较低的水平。而在培养液中加入蛹脑提取物后，前胸腺被活化，培养4 h前胸腺的合成和分泌达到高峰，培养6 h虽有增加但不显著，再延长培养时间，前胸腺的合成和分泌趋于稳定。因此前胸腺的体外培养选择6 h为宜。

2.2 不同发育期的末龄幼虫和化蛹当天的前胸腺的合成和分泌机能

分别将末龄幼虫1，2，3，4，5，6天和化蛹当天的一侧前胸腺放入50 μL含1个蛹脑当量的蛹脑提取物的培养液中，另一侧放入不含蛹脑提取物的培养液中，培养6 h，测定培养液中蜕皮甾类激素，其中活化比为处理组与对照组的比值，见图2。

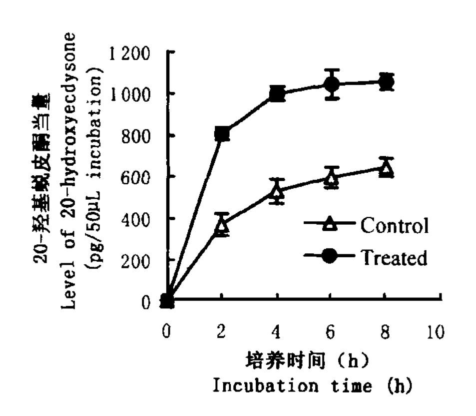


图1 前胸腺合成和分泌蜕皮甾类激素的时相进程

Fig.1 Time course of ecdysteroid synthesis by prothoracic glands of *M. separata*

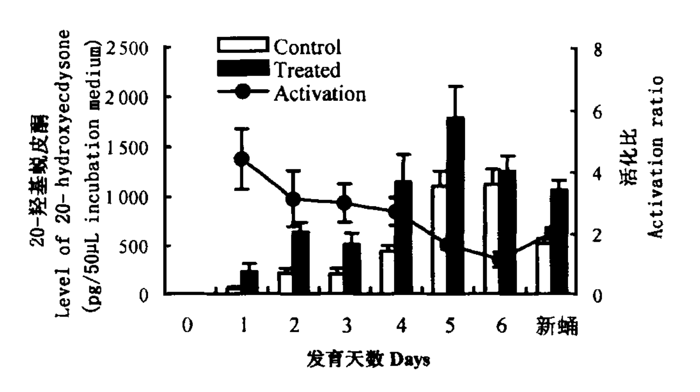


图2 蛹脑提取物对末龄幼虫和新化蛹的前胸腺活性的影响

Fig.2 Effect of pupal brain extracts on the activity of prothoracic glands from instar larvae and newly formed pupae

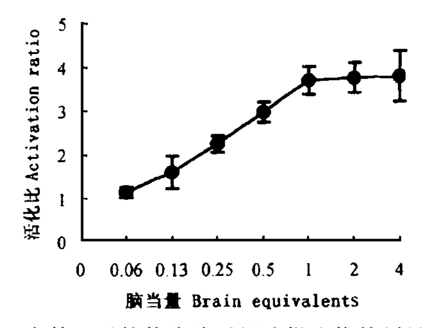


图3 末龄2天的前胸腺对蛹脑提取物的剂量反应

Fig.3 Dose responses of prothoracic glands of day-2 last instar larvae to pupal brain extracts

前胸腺在不加蛹脑提取物的培养液中培养，有不同程度的自发分泌蜕皮甾类激素的能力，以末龄第1天最低，第6天最高，化蛹当天的前胸腺的合成和分泌有所降低，即在化蛹前，前胸腺的合成和分泌有一高峰。而在培养液中加入蛹脑提取物后，前胸腺的合成和分泌明显增加，活化比以第1天最高，第6天最低，即发育早期的前胸腺对蛹脑提取物的反应较发育后期的前胸腺敏感。

2.3 前胸腺对蛹脑PTTH样活性物质的剂量反应

末龄幼虫2天的前胸腺，一侧分别在含有4.0，2.0，1.0，0.5，0.25，0.125和0.06蛹脑当量的蛹脑提取物的培养液中，另一侧的培养液不含蛹脑提取物，培养6 h后测定培养液中的蜕皮甾类激素。结果以活化比为纵坐标对蛹脑提取物的剂量的对数做图，呈典型的Logistic曲线。

从图3可以看出，用0.06蛹脑当量即可以使前胸腺活化，活化比为1.15，用1.0蛹脑当量，可以显著地促进前胸腺的合成和分泌，活化比为3.71。培养液中再增加蛹脑提取物的量，前胸腺合成分泌蜕皮激素能力增加不明显，即蛹脑提取物中PTTH样的活性物质对前胸腺的活化达到了饱和，饱和激活剂量为1.0蛹脑当量。

3 讨论

本文用放射免疫测定方法和前胸腺离体培养技术，对粘虫蛹脑提取物的作用和幼虫前胸腺的分泌活动进行了研究。从实验中可以看出，粘虫蛹脑（化蛹 0～3 h 内）提取物中存在能促进前胸腺合成和分泌蜕皮甾类激素的 PTTH 样活性物质，在离体条件下，前胸腺在一定量 PTTH 样活性物质的作用下，能很快合成和分泌蜕皮甾类激素。这一点已在许多鳞翅目昆虫和一些双翅目昆虫中得到证实[8]。在昆虫生长发育的不同时期，前胸腺具有不同的合成和分泌机能，对 PTTH 反应的敏感度也不一样，当前胸腺基础分泌率较低时，PTTH 对它的促进较明显。这些变化表明，蜕皮激素的合成和分泌是受到调控的[9]。粘虫蛹脑 PTTH 样活性物质对前胸腺的剂量反应与其它昆虫的 PTTH 对前胸腺的剂量反应一致[4,5]。

过去一般认为蜕皮激素的生物合成只受 PTTH 的正刺激，但近年来的研究表明，脑也分泌一种抑制蜕皮激素生物合成的神经肽。有研究者从一种丽蝇 *Calliphora vicina* 脑中纯化出具有抑制前胸腺合成和分泌蜕皮激素的肽类激素——前胸腺抑制激素（Prothoracicostatic hormone，PTSH）[10]。那么在粘虫蛹脑中是否也存在 PTSH 呢？如果存在，可能是因为蛹脑粗提物中的 PTTH 和 PTSH 协同作用于前胸腺，PTTH 的作用远大于 PTSH 的作用，因而在生物测定过程中只看到促前胸腺的作用。这仅是一种推测，许多问题有待进一步研究。

参 考 文 献 （References）

[1] Bollenbacher W E，Granger N A. Endocrinology of the prothoracicotropic hormone. In：Kerkut G A，Gilbert L I eds. Comprehensive Insect Physiology，Biochemistry and Pharmacology. New York：Pergamon. 1985，7：109～151

[2] Nijhout H F. Insect Hormones. Princeton，New Jersey：Princeton University Press. 1994

[3] Kawakami A，Iwami M，Nagasawa H *et al*. Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. Science，1990，247：1 333～1 335

[4] 华跃进，曹梅讯，吴载德. 桑蚕促前胸腺激素的作用与前胸腺分泌活动的某些特点. 昆虫学报，1988，31（2）：123～128

[5] 郭素堂，刘瑞林，蒋容静等. 亚洲玉米螟末龄幼虫促前胸腺激素与蜕皮甾类激素滴度的变化. 昆虫学报，1992，35（1）：15～21

[6] 毕富春. 粘虫的简易人工饲料及防腐剂对生长发育的影响. 昆虫知识，1983，20（6）：260～263

[7] 曹梅讯. 20-羟基蜕皮酮的放射免疫分析法及在蓖麻蚕上的应用. 昆虫学研究集刊，1980，第一集，1～6

[8] Koolman J. Control of ecdysone biosynthesis in insects. Neth. J. Zool.，1995，45：83～88

[9] Smith S L. Regulation of ecdysteroid titer：Synthesis. In：Kerkut G A，Gilbert L I eds. Comprehensive Insect Physiology，Biochemistry and Pharmacology. New York：Pergamon. 1985，7：295～341

[10] Hua Y J，Jiang R J，Koolman J. Multiple control of ecdysone biosynthesis in blowfly larvae：Interaction of ecdysiotropins and ecdysiostatins. Arch. Insect Biochem. Physiol.，1997，35：125～134

Effect of prothoracicotropic hormone-like material from pupal brains on synthesis and secretion of prothoracic gland in *Mythimna separata*

OUYANG Ying-chun，TANG shuang，GUAN Xue-chen

（Institute of Zoology，Academia Sinica，Beijing　100080）